

Modellierung, Herstellung und Evaluierung von Polymer-Protein-Kompositen mittels additiver Fertigungstechnologien

S. Sdrenka, M. Schulz, L.M. Marin, G. Ziegmann*

Clausthaler Zentrum für Materialtechnik (CZM)

Email: sebastian.sdrenka@tu-clausthal.de

*J. Bertram**

IBA Lifesciences

E-Mail: Bertram@iba-lifesciences.com

Abstract

Die Biologisierung wird als “Zusammenführung technischer und biologischer Komponenten und Prozesse definiert”. Vorreiter in dieser Disziplin sind neuartige Prozesstechnologien in der Herstellung von innovativen ingenieurs- und materialwissenschaftlichen Entwicklungen, sowie moderne Medizintechnik und Life Science Anwendungen. Das Clausthaler Zentrum für Materialtechnik (CZM) arbeitet zusammen mit der IBA Lifesciences GmbH, Göttingen im Bereich der Zellseparation an dieser innovativen Thematik.

Mit der von IBA entwickelten Fab-TACS® Technologie (Traceless Affinity Cell Selection) ist es bereits heute möglich, spezifische Zellen und subzelluläre Komponenten wie beispielsweise Exosomen in einem zellschonenden Verfahren aus Vollblutproben in hoher Qualität, Ausbeute und Reinheit aufzureinigen. Dieser bereits marktfähige Ansatz wird im Rahmen des Förderprogramms Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) als interdisziplinäres Kooperationsprojektes BioReg (Fördernummer: 16KN053640/-41) weiterentwickelt. Das Ziel ist es, mittels additiver Fertigungstechnologie diese Zelltrenntechnologie in einem mehrstufigen Verfahren für eine kostengünstige industrielle Fertigung mit den erforderlichen hohen Qualitätsansprüchen weiter zu entwickeln. Dabei werden die Modellierung der Separationseinheit, die Mikrofluidik, die Funktionalisierung des Materials zu Polymer-Protein-Kompositen und die Optimierung der Anwendung unter Berücksichtigung der spezifischen Anforderungen intensiv betrachtet.

Die Modellierung der Separationseinheit folgt dabei im Wesentlichen drei geometrischen Ansätzen: (a) einer Packung aus definierten Grundkörpern, wie Kugeln, in verschiedenen Anordnungen, (b) komplexen, in sich selbst verdrehten Oberflächen, den sogenannten Gyroiden und (c) einer Hohlzylinderstruktur mit definierten Aussparungen in der Oberfläche in Form von Löchern und Spalten. Dabei sind das Oberfläche-zu-Volumenverhältnis und die grundsätzlich reproduzierbare, qualitativ hochwertige Herstellbarkeit ganz wesentliche Bewertungskriterien.

Die Herstellung derart komplexer Strukturen, teils mit aufwendigen Hinterschneidungen und Aussparungen, ist mit klassischen Herstellungsverfahren, wie dem Spritzgussverfahren, nicht in einem Prozess realisierbar. Moderne additive Fertigungsverfahren bieten zahlreiche Vorteile bei der Herstellung der zuvor genannten Strukturen. Speziell die Stereolithographie-Technologie (SLA) ermöglicht die Verarbeitung eines Kunstharzes bei niedrigen Temperaturen, wie es für die angestrebten Komposite mit Biologicals, also Proteinen zwingend erforderlich ist. Die Abbildungsgenauigkeiten bis zu 300 µm werden den speziellen Anforderungen an die Geometrie gerecht, so dass ein Einsatz für die Zellseparation denkbar ist.

Ziel der gemeinsamen Arbeiten ist die Modifikation des Ausgangsmaterials zu speziellen Polymer-Protein-Kompositen in Fortführung der Ergebnisse des Vorläuferprojektes einer Mehrkomponenten-Kartusche für die spezifische Zellseparation (ZIM Zellclean, Fördernummer 16KN053624/-25). Dabei gilt es einerseits das Polymer vor der Verarbeitung mit dem Protein im richtigen Verhältnis zu verbinden, andererseits die Funktionalität bei der Verarbeitung zu erhalten und in die Anwendung für die IBA-eigene Zelltrenntechnologie zu überführen. Die Übertragung auf Polymere in Form von funktionalisiertem Polystyrol bzw. amino-Silica-Beads und additiven Fertigungsverfahren wurde begonnen.

Dieser Beitrag bietet einen Zwischenstand der bereits erarbeiteten Projektergebnisse und diskutiert diese mit Blick auf die verschiedenen spezifischen Rahmenbedingungen für die geplante Anwendung. Im Rahmen der Diskussion werden die verschiedenen Lösungsansätze bewertet.

1 Polymer-Protein-Komposite für die Medizintechnik

Die Idee, Polymer-Protein-Komposite für medizintechnische Applikationen einzusetzen, insbesondere für die spezifische Zellseparation, basiert auf dem erfolgreich abgeschlossenen Projekt Zellclean, mit dem Schwerpunkt der Entwicklung und Erprobung

eines neuartigen Consumables für Life Science Anwendungen am Beispiel einer Separationseinheit für die Zellreinigung. Durch vereinfachte Vorversuche konnten Strukturen modelliert werden, die für die Separation von spezifischen Zellen aus Vollblut großes Potenzial bieten. Darüber hinaus konnte ein Protein, das Strep-Tactin[®], erfolgreich mit einem flüssigen Kunstharz verbunden und durch additive Fertigung in Form gebracht werden. Auf Basis dieser Ergebnisse haben sich zahlreiche komplexe Fragestellungen und Lösungsansätze ergeben, die aktuell im Projekt BioReg erarbeitet werden.

Grundlage aller Untersuchungen ist die von der IBA entwickelte T-Catch[®]-Technologie und deren Weiterentwicklung, die Fab-TACS[®]-Technologie (Traceless Affinity Cell Selection) für die reversible Immunchromatographie von Zellen, die hochwertige, nicht manipulierte, authentische Zellen mit hoher Reinheit und guter Ausbeute liefert. Eine vergleichbare Technologie steht bisher auf dem Markt nicht zur Verfügung. Alternativ eingesetzte Magnetbead-Technologien oder der Einsatz hochaffiner Antikörper zur Zellseparation weisen verschiedene Nachteile auf. Hochaffine Antikörper können zu Zellveränderungen wie Differenzierung oder Proliferation führen bzw. bei den Zellen sogar den Mechanismus für den programmierten Zelltod, die so genannte Apoptose, auslösen. Dies sind nachteilige Veränderungen des Zellproduktes im Rahmen der Isolierung. Die Magnet-basierte Zellreinigung kann zu einer hohen mechanischen Belastung der Zellen führen und damit unter Umständen sogar zur Zelllyse, der Schädigung oder Auflösung der äußeren Zellmembran, mindestens aber zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität, dem Anteil lebender Zellen. Der Vorteil der IBA Technologie liegt also in der reversiblen Bindung der spezifischen Zell-Isolierungsreagenzien, der Fab-TACS[®] Moleküle und führt zu einer höheren Qualität des Zellproduktes und einer höheren Viabilität der Zellen. Dies dokumentiert sich in einer hohen Proliferation der Zellen, wie es beispielsweise in der Herstellung von T-Zell-Produkten unter Verwendung der IBA Expamer[®] Technologie zur Anwendung kommt.

Die Fab-TACS[®] Technologie arbeitet über ein Affinitäts-Bindungssystem. Auf der Oberfläche einer Separationsmatrix wird ein rekombinant in Escherichia coli (E. coli) Bakterien hergestelltes Protein, das sogenannte Strep-Tactin[®] gebunden. Über das Strep-Tactin[®] wird mittels eines Aminosäure-tags, dem TWIN-Strep-tag[®], ein rekombinant hergestelltes Fab-TACS[®] Molekül gebunden. Dieses Fab-TACS[®] Molekül vermittelt die spezifische Bindung der Zielzellen über ein Oberflächenmolekül, dem Rezeptor, auf den Zielzellen. Anschließend wird mit Biotin die Verbindung zwischen dem Strep-Tactin[®] und dem Strep-tag[®] gelöst, da Biotin die höhere Affinität zur Bindungsstelle im Strep-Tactin[®] besitzt (Abb. 1). In der Folge stehen dem Anwender die Zielzellen in hoher Reinheit und Ausbeute zur Verfügung, gänzlich ohne das zuvor verwendete spezifische Isolierungsreagenz.

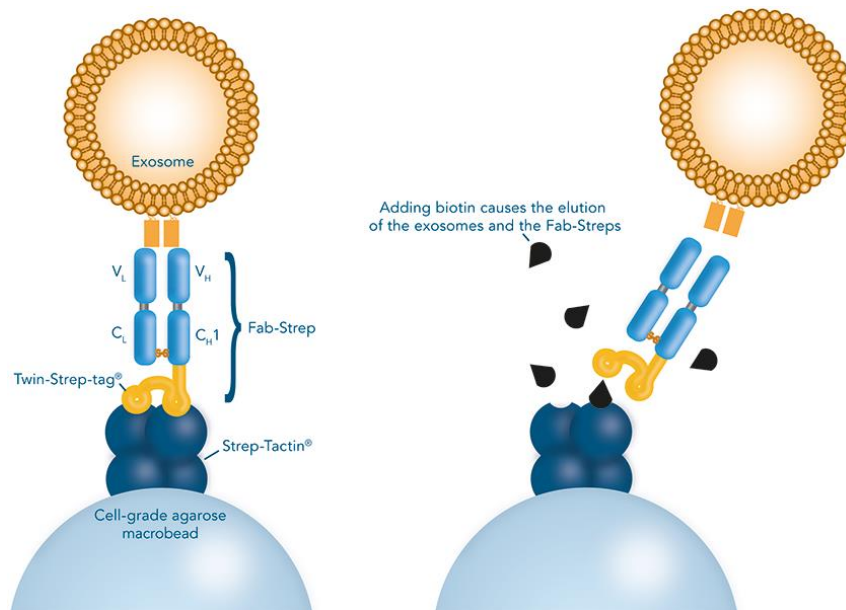


Abb. 1: Spezifische Zellseparation auf Basis der IBA Technologie mit Strep-Tactin®: a) Bindung der Zielzelle und b) Ablösung der Zielzelle durch Biotin

Der Separationsprozess, der mehrere aufeinanderfolgende Prozessschritte erfordert, läuft automatisiert mit einem Analysegerät, dem FABian®, ab. In einem definierten geometrischen Raum, der die Separationsmatrix einschließt, umgangssprachlich die Kartusche, werden durch die einzelnen Prozessschritte zunächst die Zielzellen gebunden und später als reine Zielfraktion gelöst. Für eine gute Ausbeute intakter Zellen darf die Mikrofluidik nicht durch beispielsweise raue Oberflächen oder scharfe Kanten gestört werden. Eine weitere Voraussetzung für eine hohe Ausbeute ist, dass ausreichend Bindemöglichkeiten für die Zielzellen über das Strep-Tactin® angeboten werden.



Abb. 2: Automatisierte Zellseparation: a) FABian®, b) Trenneinheit und c) zusammengesetzte Kartusche

Die kugelförmige und fluiddurchlässige Separationsmatrix besteht derzeit aus Agarose, einem Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, wobei aktuell

auch Alternativen intensiv untersucht und ausgewertet werden. Der Durchmesser der Agarose-Beads liegt in einem Bereich zwischen 40 µm und 80 µm.

Hauptgegenstand der aktuellen Entwicklungsarbeiten ist die Kartusche (*Abb. 2*). Die mehrteilige Spritzgusslösung soll in eine additiv gefertigte Kartusche umgewandelt werden. Als Basis dient ein flüssiges Kunstharz, das unter UV Licht ausgehärtet werden kann. Das Protein soll im Rahmen einer Materialmodifikation direkt eingebunden werden und die Oberfläche des Kunstharzes funktionalisieren. Gelingt es unter den gegebenen Randbedingungen ein stabiles und reproduzierbares System auf Basis Polymer-Protein-Kompositen zu entwickeln, ergeben sich für die spezifische Zellseparation und darüber hinaus zahlreiche Optionen auf die Weiterentwicklung der Technologie.

Neben dem Einsatz in der Zelltrennung und –reinigung sind zahlreiche weitere Anwendungsgebiete im Bereich Life Science, Medizin- und Pharmatechnologie für die komplexen Strukturen mit funktionalisierten Oberflächen denkbar. Zentrales Merkmal für den Stoffaustausch und die Zellreinigungseffizienz ist dabei das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und der Grad der Verzweigung, den das Fluid innerhalb der definierten Separationsgeometrie zurücklegen muss. Dies bestimmt maßgeblich die Kontaktzeit zwischen den Zellen und den Bindungsmolekülen auf den Kontaktflächen.

Der zukünftige Einsatz auf dem weiten Feld der Regenerativen Medizin ist als besonders vielversprechendes Beispiel für mögliche Anwendungen zu nennen. Die Regenerative Medizin selbst ist ein noch relativ neues Feld der Biomedizin und befasst sich mit der Heilung verschiedener Erkrankungen durch die Wiederherstellung funktionsgestörter Zellen, z.B. durch Stammzelltransplantation, Zelltherapien allgemein, aber auch durch Gewebe- und Organ-Ersatz zum einen durch den biologischen Austausch, beispielsweise durch gezüchtete Gewebe bzw. Organe, aber auch durch die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse. Ganz aktuelle Forschungs- und Entwicklungsansätze befassen sich mit dem sogenannten „Tissue Engineering“, dem Züchten von Gewebe- und Zellverbänden und der Gentherapie, d.h. der Reparatur oder dem Ersatz defekter Erbinformationen.

Die Entwicklung von Polymer-Protein-Kompositen und funktionalisierten Oberflächen haben das Potenzial, einen umfangreichen Beitrag zu den oben genannten Punkten und darüber hinaus zu leisten.

2 Verarbeitungsmöglichkeiten für Polymer-Protein-Komposite

Das Vorhaben verfolgt mit Fokus auf die Zelltrennung diesen neuen und höchst innovativen Ansatz über die Fertigung von Consumables auf Grundlage der Additiven Fer-

tigung. Das Ziel ist die Entwicklung von komplexen und flexibel einsetzbaren 3D-gedruckten Strukturen, deren Oberflächen mit funktionalen Elementen, spezifischen Proteinen, besetzt sind. Dabei werden die Proteine selbst in den Druckvorgang eingebracht, in Form der Fertigung von Co-Polymeren, so dass die bisher eingesetzte Separationsmatrix auf Agarose-Basis wegfällt und im Fertigungsprozess der Separationseinheit zusammen mit einer für die Zelltrennung geeigneten Geometrie frei konfiguriert wird. Die so erhaltenen funktionalen Strukturen in Form von Kugelpackungen, komplex aufgebauten und in sich selbst verdrehten Anordnungen werden dann in frei kombinierbaren Segmenten für die optionale Trennung von verschiedenen Zellfraktionen in Kombination mit dem FABian® für die Zelltrennung biologisch evaluiert, eingesetzt und zu einem marktfähigen Gesamtsystem entwickelt.

Für den Einsatz von additiven Fertigungsverfahren in Kombination mit Proteinen müssen definierte Randbedingungen erfüllt werden, allen voran die Materialverträglichkeit zwischen Polymer, Protein und Zellen, die Eignung respektive die Zulassung zu medizintechnischen Applikationen sowie die volumentaugliche Herstellung für eine wirtschaftliche Anwendung.

Als Verfahren der Wahl wird die Stereolithografie forciert. Wesentliche Vorteile sind die Verfügbarkeit von biologisch verträglichen und medizinisch zugelassenen Kunstharzen sowie geringe Verarbeitungstemperaturen unterhalb der Denaturierungstemperatur der eingesetzten Proteine. Das flüssige Kunstharz ist zudem geeignet mit gelösten Proteinen kombiniert zu werden.

Die Stereolithografie (SLA) zählt zu den Flüssigdruckverfahren. Bei diesem Verfahren wird ein photoreaktives Polymer im flüssigen niedermolekularen Zustand über den Energieeintrag eines Laserstrahls im UV-Licht Bereich, je nach Drucksystem etwa bei 395 ... 405 nm, schichtweise und punktgenau innerhalb kürzester Zeit ausgehärtet (Abb. 3). Die Schichtdicke liegt dabei im Mikrometerbereich, beim eingesetzten Formlabs Form 2 bei 25 ... 300 µm bei einer Laserspotgröße von 140 µm. Diese Werte beeinflussen unmittelbar die minimal erreichbare Abbildungsgenauigkeit. Die zu Grunde liegende chemische Reaktion der Aushärtung ist eine Polymerisation. Die Polymerisationsreaktion ist mit dem Druckprozess allerdings noch nicht abgeschlossen. Die Bauteile haben nach dem Drucken zwar die endgültige Form, dennoch liegen im Bauteil selbst nicht verknüpfte chemische Verbringungen vor, was sich nachteilig auf die Materialeigenschaften, insbesondere die Härte, auswirkt. Über einen Nachhärteprozess können die Materialeigenschaften unter definierten Bedingungen das materialspezifische Optimum erreichen. Haupteinflussfaktoren sind UV-Licht und Temperatur. Wärme regt das Netzwerk dreidimensional verknüpfter Polymerketten zu höherer molekularer

Beweglichkeit an. Das UV-Licht fördert bei einer Wellenlänge von 405 nm die chemische Verbindung freier reaktiver Gruppen. In Summe steigt damit der Grad der Quervernetzungen und verbessert die mechanischen Materialeigenschaften. Auch Tages- bzw. Sonnenlicht kann diesen Effekt bewirken, aufgrund der geringeren Intensität allerdings deutlich langsamer und nicht vollständig.

Technisch betrachtet hängt der Schichtaufbau der gedruckten Struktur also von der Feinheit des Lasers bzw. dessen Bündelung über ein Linsensystem ab. Im Bauraum selbst ist das zentrale Element ein Vorratsbehälter, gefüllt mit lichtempfindlichem Kunstharz, bestehend aus Monomeren, Oligomeren, Photoinitiatoren und ggf. weiteren Additiven, das nach jedem Schichtaufbau durchmischt wird, um eine homogene Verteilung der Harzbestandteile und insbesondere der Photoinitiatoren zu gewährleisten. Die gedruckte Struktur wird im definierten Druckraum über eine bewegliche, absenkbare Plattform um die jeweilige Position verfahren. Dieser Verfahrensablauf durchläuft eine programmierte Schleife, bis das in Schichten zerlegte CAD-Modell und ggf. erforderliche Stützstrukturen gefertigt sind.

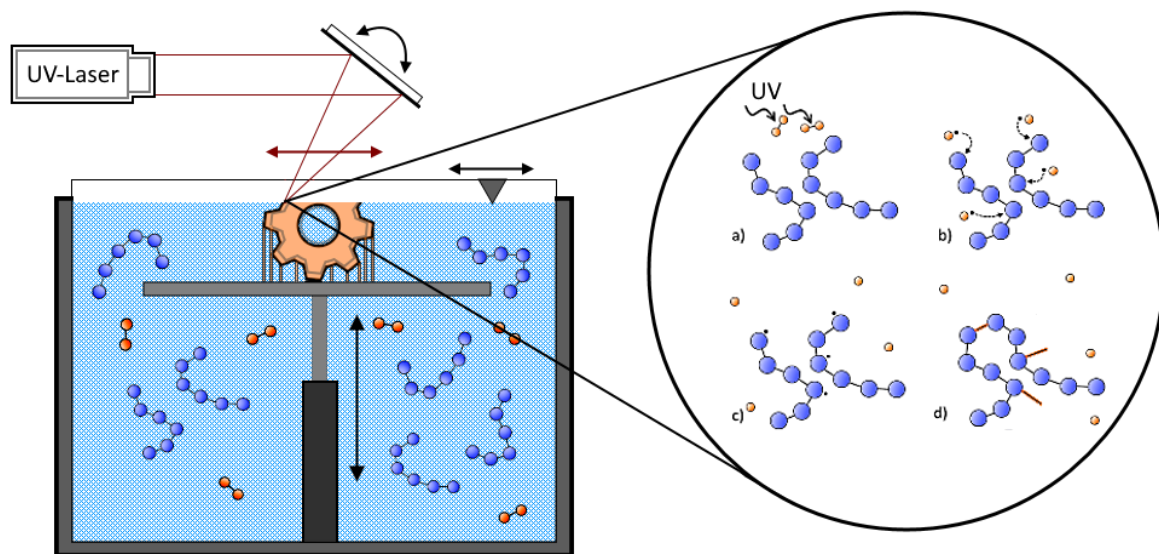


Abb. 3: Schematische Darstellung der Stereolithografie und der Polymerisationsreaktion

Abhängig von der geometrischen Komplexität der CAD-Modelle sind bei diesem Druckverfahren äußere und innere Stützstrukturen für die Stabilität erforderlich. Diese können durch Nachbearbeitung manuell entfernt werden, beeinträchtigen unter Umständen aber die Oberflächenrauigkeit. Um den Nachbearbeitungsaufwand minimal zu halten, bieten eine softwaregesteuerte Minimierung der Stützen sowie eine lokale Verfeinerung am Übergang von Geometrie zu Stütze die Möglichkeit zur Optimierung.

Mit Blick auf das modifizierte Ausgangsmaterial ist das Protein die kostenintensive Komponente. Eine zentrale Herausforderung für die Verarbeitung ist es, das Protein nur

auf der Oberfläche der additiv gefertigten Geometrie in möglichst hoher Konzentration zu binden und damit günstige Ausgangsbedingungen für die Zellseparation zu schaffen. Inaktives Wandmaterial ist mit Blick auf die Wirtschaftlichkeit und Verfahrensqualität unerwünscht und weitestgehend zu vermeiden.

3 Modellierung von Kleinststrukturen für die Zellseparation

Hierzu sind zunächst geeignete, stark inhomogene oder hierarchisch aufgebaute Strukturen mit einem ausreichend großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu modellieren, mit denen trennspezifische Kennwerte wie ein hoher Umsatzgrad sowie gute Selektivität und Reinheit der zu trennenden Fraktion zu erreichen sind. Bei der Modellierung ist darauf zu achten, dass die Strukturen neben einem Netzwerk aus Strömungskanälen für eine ausreichende Verweilzeit des Fluidstroms keine Phänomene, wie Strömungstotzonen oder Strömungskanäle bzw. im Randbereich zu starke Wandgängigkeit aufweisen.

Für den zuvor skizzierten Anwendungsfall sind drei Arten von modellierten Strukturen betrachtet worden: Kugelpackungen, komplexe, in sich selbst verdrehte Strukturen und ein Hohlzylinder mit definierten Lochstrukturen.

3.1 Kugelpackungen

Die Kugelpackungen (Abb. 4) sind bezogen auf das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen die ungünstigste Variante. Über die Verbindung von Stegen zwischen den Vollkugeln werden dafür hohe Stabilität und gute Durchmischung geboten (Abb. 5).

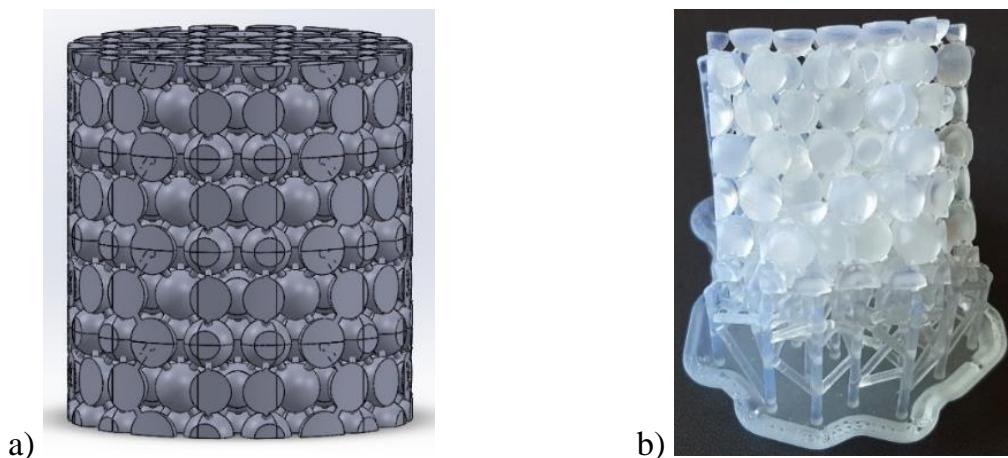


Abb. 4: Modell der primitiven Kugelpackung mit $KZ = 4$, $d_{Kugel} = 1,5 \text{ mm}$, $d_{Steg} = 0,3 \text{ mm}$ und $l_{Steg} = 0,25 \text{ mm}$: a) CAD-Modell und b) additiv gefertigtes Modell mittels Formlabs Form 2

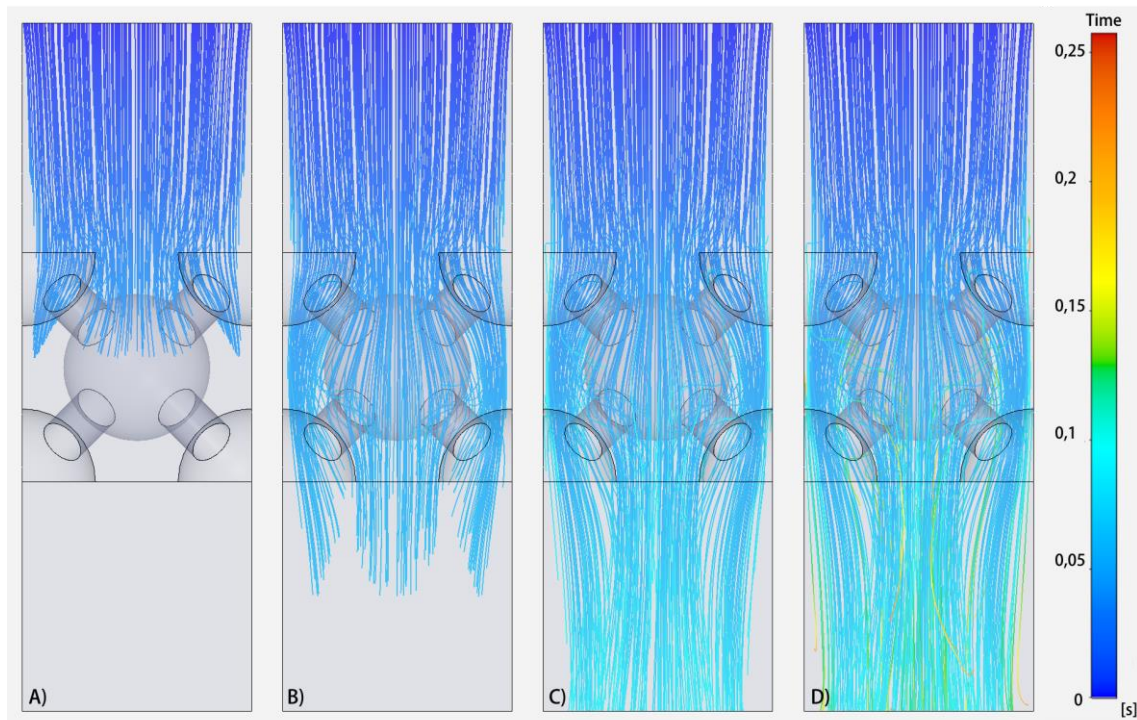


Abb. 5: Strömungssimulation für repräsentatives Volumenelement aus Modell der primitiven Kugelpackung mit $KZ = 4$, $d_{Kugel} = 1,5 \text{ mm}$, $d_{Steg} = 0,3 \text{ mm}$ und $l_{Steg} = 0,25 \text{ mm}$

3.2 Komplexe, in sich selbst verdrehte Strukturen

Komplexe, in sich selbst verdrehte Strukturen, wie Gyroide, bieten ein deutlich besseres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (Abb. 6). Andererseits ist die Stabilität und damit der allgemeine Einsatz aufgrund der dünnen Wandstärke nur eingeschränkt. Durch eine die Struktur umspannende äußere Zylinderwand kann dieser Nachteil etwas ausgeglichen werden, dafür müssen allerdings nicht durchströmte Randbereiche akzeptiert werden. Die fluidische Durchmischung erfüllt die Voraussetzungen für den Einsatz für die Zellseparation (Abb. 7).

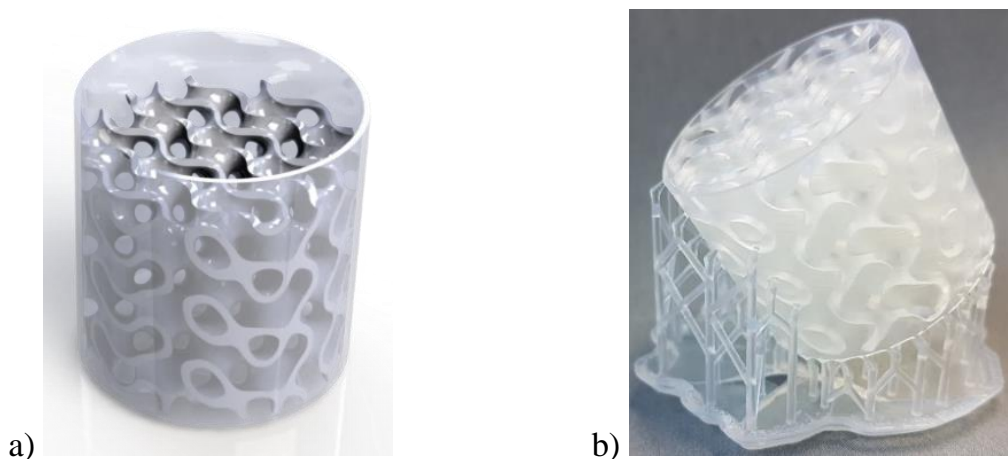


Abb. 6: Modell für komplexe und in sich selbst verdrehte Strukturen mit $d_{Wand} = 0,3 \text{ mm}$: a) CAD-Modell und b) additiv gefertigtes Modell mittels Formlabs Form 2

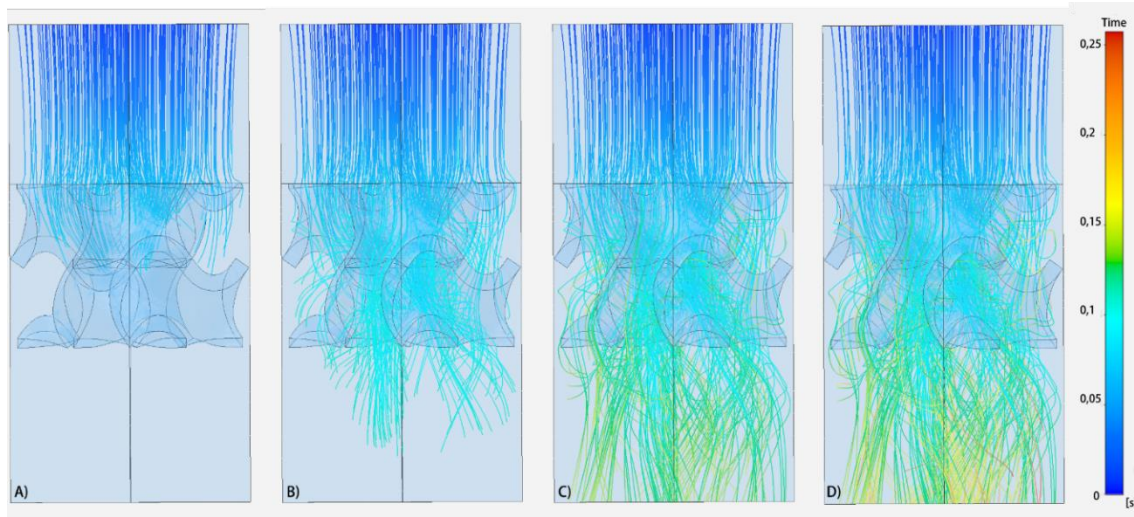


Abb. 7: Strömungssimulation für repräsentatives Volumenelement aus einem Modell für komplexe und in sich selbst verdrehte Strukturen mit $d_{\text{Wand}} = 0,3 \text{ mm}$

3.3 Definierte Lochstrukturen

Als dritte Variante werden definierte Aussparungen in der Oberfläche in Form von Löchern und Spalten betrachtet. Der Materialeinsatz ist bei dieser Variante am sparsamsten. Die größte Herausforderung ist die reproduzierbare Genauigkeit der Oberflächenqualität. Da jeder Druckvorgang bedingt durch das Zerlegen des CAD Datensatzes in Einzelschichten und die geometrische Ausrichtung des Bauteils individuell ist, schwankt die Abbildungsgenauigkeit enorm in Abhängigkeit der Wandstärke, des Krümmungswinkels und der Bauteilorientierung im Drucker selbst.

Mit einer plattenförmigen Testgeometrie (Abb. 8) samt definierten Aussparungen konnte die Grenze des eingesetzten Druckverfahrens zwar näherungsweise bestimmt und statistisch belegt werden, dennoch zeigen Versuche an der dreidimensionalen Geometrie eines Hohlzylinders, dass es noch unbekannte Einflussfaktoren gibt, die das Ergebnis der räumlichen Strukturierung ein Stück weit zufällig ausfallen lassen.

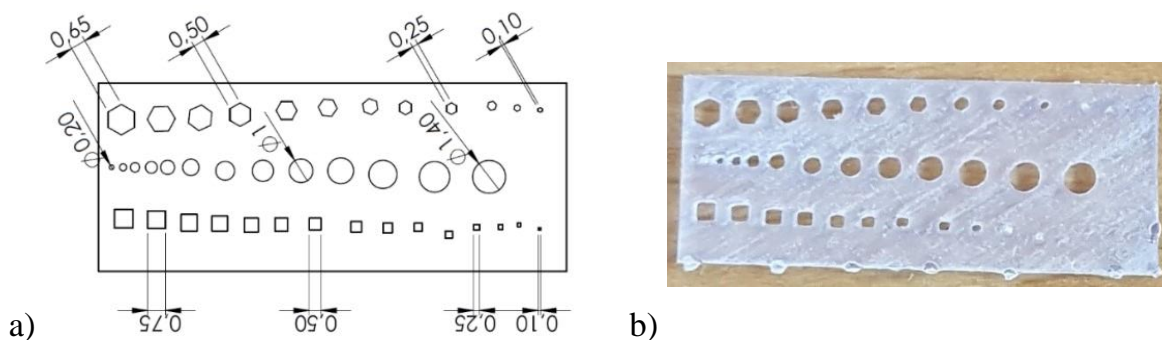


Abb. 8: Modell einer ebenen Plattengeometrie mit definierten Lochstrukturen mit $d_{\text{Wand}} = 0,3 \text{ mm}$ und $d_{\text{Loch}} = 0,1 \dots 1,4 \text{ mm}$: a) CAD-Modell und b) additiv gefertigtes Modell mittels Formlabs Form 2

Mit Blick auf das Oberfläche zu Volumen Verhältnis wird mit der Hohlzylindergeometrie der geringste Wert erreicht (Abb. 9). Die Stabilität ist für den Anwendungsfall geeignet, wobei auf eine definierte geringe Druckbelastung beim allgemeinen Handling zu achten ist.

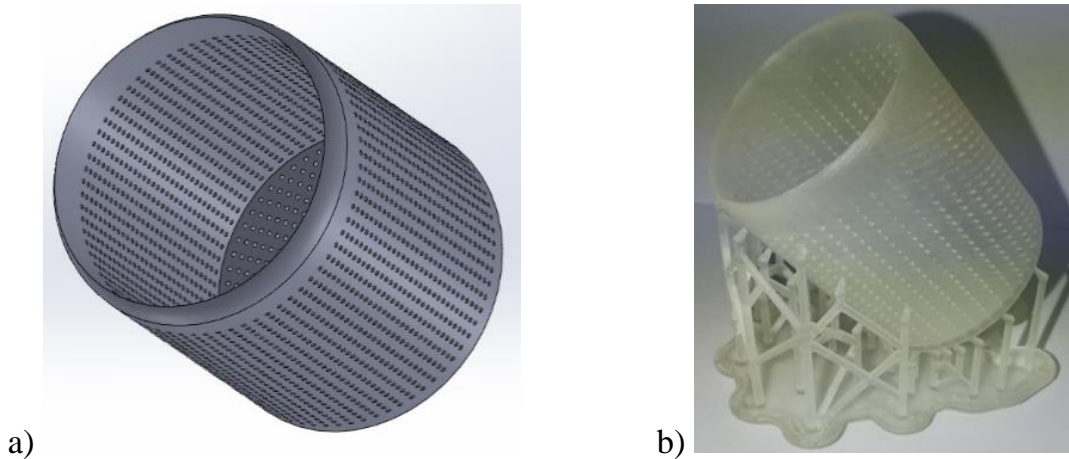


Abb. 9: Modell eines Hohlzylinders mit definierten Lochstrukturen mit $d_{\text{Wand}} = 0,3 \text{ mm}$ und $d_{\text{Loch}} = 0,3 \text{ mm}$: a) CAD-Modell und b) additiv gefertigtes Modell mittels Formlabs Form 2

Die optimale Geometrie wird erst im Anwendungsfall feststehen, wenn qualitative und quantitative Parameter der Zellseparation, wie Ausbeute, Reinheit und Selektivität unter Berücksichtigung des Einflusses der Spendervarianz feststehen.

4 Nachweis der Machbarkeit von Polymer-Protein-Kompositen

Ein zentraler Fokus der Untersuchungen ist die Entwicklung des Polymer-Protein-Komposites, also die Integration des Proteins Strep-Tactin® in ein definiertes Kunstharzsystem. Die erfolgreiche und funktionstüchtige Materialkombination konnte durch einen Fluoreszenznachweis erbracht werden. Dazu wurde eine mit Strep-Tactin® modifizierte Kunstharzprobe händisch gemischt und unter UV Licht bei geringer Intensität bei Raumtemperatur ausgehärtet. Im Idealfall gibt es aktive Proteinkomplexe mit aktiven Bindungsstellen an der Oberfläche. Fluoreszierende Proteine mit einem TWIN-Streptag®, wie mCherry und eGFP, können an diese aktiven Zentren binden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop emittieren diese Materialkomplexe bei einer definierten Anregung im Falle von mCherry mit 587 nm und bei eGFP mit 488 nm das Licht jeweils bei einer Wellenlänge von 610 nm bzw. bei 510 nm, welches dann als Fluoreszenz wahrgenommen werden kann (Abb. 10). Dieser Nachweis ist für beide Komplexe erfolgreich erbracht worden und somit ein Meilenstein auf dem Weg für den Einsatz der Polymer-Protein-Komposite für die Zellseparation.

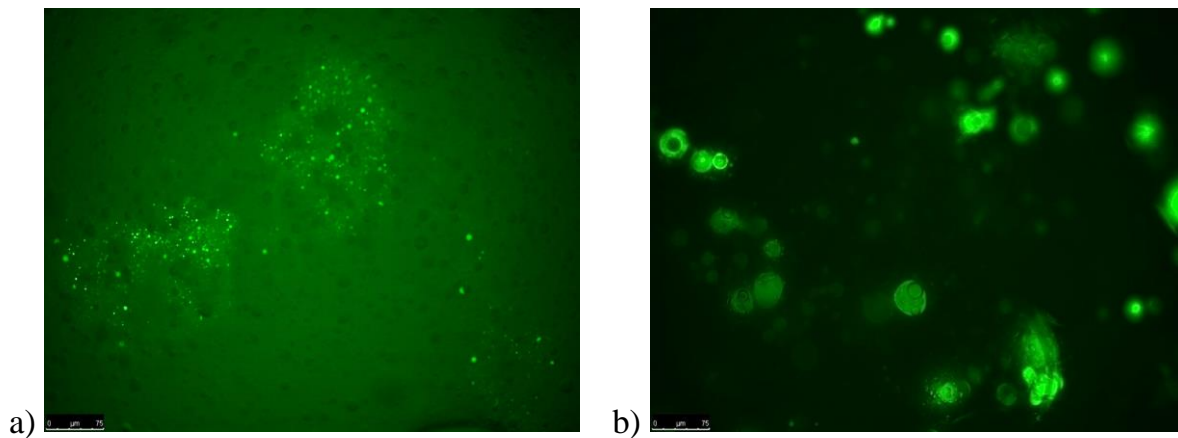


Abb. 10: Fluoreszenznachweis der modifizierten Polymer-Protein-Komposite: a) weite Zoomansicht und b) nahe Zoomansicht

Auch wenn der grundsätzliche Nachweis der Machbarkeit erbracht und vielversprechend ist, bleiben noch zahlreiche Fragestellungen offen. Im Folgenden gilt es das optimale Mischungsverhältnis zwischen Kunstharz und Protein zu ermitteln. Dabei sollen Wandstärken möglichst dünn sein und viele aktive Zentren für eine gute Ausbeute bei der Zellseparation an der Oberfläche lokalisiert sein. Anschließend gilt es den Prozess zu automatisieren und parallel den Wirkungsgrad und die Interaktion mit den Zellen zu testen.

5 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die Entwicklung von Polymer-Protein-Kompositen in Kombination mit additiven Fertigungsverfahren für den Einsatz in der Grundlagenforschung und in abgeleiteten Anwendungen, konkret für die spezifische Zelltrennung, ist neu und äußerst attraktiv. Ausgehend von diesem Beispiel sind den Einsatzmöglichkeiten von funktionalisierten Oberflächen in Form von Polymer-Protein-Kompositen keine Grenzen gesetzt. Additive Fertigungsverfahren ermöglichen nahezu jeden Freiheitsgrad an geometrischer Modellierung, wo traditionelle Verfahren an ihre Grenzen stoßen. Auch wenn es heute noch, je nach ausgewählten Druckverfahren, Limitierungen gibt, wachsen Angebot und Breite dieser Verfahren stetig. Die Grenzen der Abbildungsgenauigkeit und die Flexibilität an Verarbeitungsparametern sowie einsetzbare Materialsysteme werden stetig verbessert.

Sollte es nicht gelingen, das Verhältnis von inaktivem Kernmaterial und aktivem Oberflächenmaterial in eine wirtschaftliche Anwendung zu überführen, besteht die Möglichkeit, den Grundkörper im volumentauglichen Verfahren, beispielsweise im Spritzguss, herzustellen und die Oberfläche mit einem UV-aushärtenden Kunstharz mit minimaler Schichtdicke auszuhärten. Zusätzliche Photoinitiatoren können das Ergebnis der gleichmäßigen Aushärtung noch verbessern.

Das Projekt leistet einen wichtigen Beitrag zur Biologisierung der Technik und verbindet verschiedene Fachrichtungen aus Wirtschaft, Wissenschaft und Forschung. Im Forschungscluster „Polymersysteme, Mikrosensorik und Biologisierung“ wird das Forschungsprofil des Clausthaler Zentrums für Materialtechnik nachhaltig geschärft.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt allen Förderern und Unterstützern dieses interdisziplinären Projektvorhabens, insbesondere den Studierenden Arthur Kammerer, Till Tetzlaff, Karl Stein, Marlon Schulz, Andreas Hippler, Liisa-Maria Marin und Johanna Marie Ley, die mit ihren aktiven Beiträgen das Projekt bereichert haben. Ein herzlicher Dank gilt gleichermaßen der IBA Lifesciences GmbH für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Darüber hinaus gilt ein herzlicher Dank dem Institut für Organische Chemie der TU Clausthal, speziell der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Schmidt und dem Institut für Physikalische Chemie der TU Clausthal, speziell der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. apl. Jörg Adams für die anregenden Diskussionen und die Messungen am optischen Fluoreszenzmikroskop.

Das Projekt BioReg ist öffentlich im Rahmen des Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie gefördert und läuft unter der Fördernummer 16KN053640/-41.

Literatur

- [1] Bertram, J.; Sdrenka, S.: Additive Fertigung Meets Life Science, Niedersächsischer Life Science Tag 2019, BioRegion, Hannover, 11/2019.
- [2] Sdrenka, S.; Kammerer, A.; Tetzlaff, T.; Bertram, J.; Ziegmann, G.: Additive Fertigung und Life Science Technologie: Eine innovative Kombination mit großem Potential für die Medizintechnik, WAK: Ingenieurwissenschaften 2019 - Jahresmagazin Kunststofftechnik, Lampertheim, 10/2019.
- [3] Sdrenka, S.; Tetzlaff, T.; Kammerer, A.; Bertram, J.; Ziegmann, G.: Konstruktion, Entwicklung und Fertigung einer Einweg-Separationseinheit für das Zellseparations-Gerät FABian®, 3. Niedersächsisches Symposium Materialtechnik, Clausthal-Zellerfeld, 02/2019.
- [4] Sdrenka, S.; Tetzlaff, T.; Kammerer, A.; Bertram, J.; Ziegmann, G.: Analysis of complex geometric structures and packed porous media for the specific cell separation.

- ration produced by additive manufacturing. Separation Techniques 2019, 8th Edition of International Conferences and Exhibition on Separation Technique, Dublin, IRE, 07/2019.
- [5] Sdrenka, S.; Kammerer, A.; Tetzlaff, T.; Kriegel, R.; Ziegmann, G.; Bertram, J.: Untersuchung von strukturierten porösen Medien für den Stoffaustausch hergestellt mittels Additiver Fertigung, Berichtsband Clausthaler Zentrum für Materialtechnik: Fortschrittsberichte der Materialforschung und Werkstofftechnik, Zeitraum von 2016-2017, (6): 194-210, Shaker Verlag, 2018.
 - [6] Weiss, R.; Gerdes, W.; Leonhardt, F.; Berthold, R.; Sack, U.; Grahner, A.: A comparative study of two separation methods to isolate monocytes, Cytometry Part A, 2018.
 - [7] Mohr, F.; Fischer, J.C.; Nikolaus, M.; Stemberger, C.; Dreher, S.; Verschoor, A.; Haas, T.; Poeck, H.; Busch, D. H.: Minimally manipulated murine regulatory T cells purified by reversible Fab Multimers are potent suppressors for adoptive T-cell therapy. European Journal of Immunology (47): 2153-2162, Issue 12, 2017.
 - [8] Pelák, O.; Kužílková, D.; Thürner, D.; Kiene, M.-L.; Stanar, K.; Stuchlý, J.; Vášková, M.; Starý, J.; Hrušák, O.; Stadler, H.; Kalina, T.: Lymphocyte Enrichment Using CD81-Targeted Immunoaffinity Matrix. Cytometry Part A, (91): 62-72, Issue 1, 2017.
 - [9] Vogel, H.: Konstruieren mit SolidWorks. Carl Hanser Verlag, 2017.
 - [10] Gebhardt, A.: Additive Fertigungsverfahren: Additive Manufacturing und 3D-Drucken für Prototyping – Tooling – Produktion. Carl Hanser Verlag, 2016.
 - [11] Barthelmie, E.; Sdrenka, S.; Ma, Y.; Brenner, G.: Numerische Untersuchungen der hydrodynamischen Dispersion in Kugelschüttungen aus porösen Mikropartikeln. Chemie Ingenieur Technik (88):298-306, Issue 3, 2016.

Autorenanschriften

Dipl.-Ing. Sebastian Sdrenka*

Technische Universität Clausthal

Clausthaler Zentrum für Materialtechnik

Leibnizstraße 9

38678 Clausthal-Zellerfeld

Telefon: +49 5323 72 3124

E-Mail: sebastian.sdrenka@tu-clausthal.de

Prof. Dr.-Ing. Gerhard Ziegmann

Technische Universität Clausthal

Institut für Polymerwerkstoffe und Kunststofftechnik

Agricolastraße 6

38678 Clausthal-Zellerfeld

Telefon: +49 5323 72 2090

E-Mail: ziegmann@puk.tu-clausthal.de

Dr. Joachim Bertram*

IBA Lifesciences

Rudolf-Wissell-Str. 28

37079 Göttingen

Telefon: +49 551 50672 118

E-Mail: Bertram@iba-lifesciences.com